

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 11178572
PUBLICATION DATE : 06-07-99

APPLICATION DATE : 22-12-97
APPLICATION NUMBER : 09353576

APPLICANT : IWATE PREFECTURE;

INVENTOR : YAMAMURA SABURO;

INT.CL. : C12N 15/09 // C12N 5/10 (C12N 15/09
, C12R 1:01)

TITLE : PROMOTOR OF GENE FOR GENTIAN
CHALCONE SYNTHASE

```
CCATGGTGT TAGCTATATC CCTATAATTC TTTTITCTT TCTTAAAAA AAATGGTCT 60
TCTCAGGAAA GAAAAAAGAA AGAAAAAGAA AGAAAGAAAG CAACACTTT TTTTACAGA 120
TATTTTATGA GACAACGCTT GTACTAGGAA GATTAAATGA ACTGACATAT ATTAGACTTT 180
CTAAAGAAAT GTTTAAGTA TGTATTTTAT GGGTAGGCA GGTACACGTG AAATGAGCT 1020
AACCGCACAA AGCCAATTTT AGTTTCCTTC TGTATAAAT ACCAACGGT OCTCCCCAT 1080
TCTTTCATCA TCACTTACTG CAATTCACCG TTTTCCGAA TTAATTCTC TCCTCAACAT 1140
TTTCTCCGC ACCCAAACCT TT 1162
```

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a promotor of the gene for gentian chalcone synthase capable of inducing petal-specific expression of a foreign gene in plant through ligation with the foreign gene and introducing the resultant product into various plants, by constituting the promotor from a specific DNA.

SOLUTION: This promotor comprises (i) a DNA having a base sequence expressed by the formula or (ii) a DNA capable of hybridizing with the above DNA under a stringent condition and having the function of this promotor. It is preferable that a plant is transformed by a recombinant expression vector having this promotor and a foreign gene to prepare a transformant.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-178572

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月6日

(51) Int.Cl.⁶
C 1 2 N 15/09
// C 1 2 N 5/10
(C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:01)

識別記号
Z N A
Z N A

F I
C 1 2 N 15/00
5/00
Z N A A
C

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平9-353576

(22) 出願日 平成9年(1997)12月22日

(71) 出願人 390023793

岩手県
岩手県盛岡市内丸10番1号

(72) 発明者 小林 仁
岩手県北上市九年橋一丁目1番4号 ビー
スフルハウス2-C号

(72) 発明者 山村 三郎
岩手県北上市新穀町一丁目6番27号 メル
ベユ北上1-404号

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 リンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター

(57) 【要約】

【解決手段】 以下の(a)又は(b)のDNAからなる
リンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター。

(a) 特定の塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジ
ェントな条件下でハイブリダイズし、かつリンドウカル
コン合成酵素遺伝子のプロモーターの機能を有するDN
A

【効果】 本発明により、リンドウカルコン合成酵素遺
伝子のプロモーター部位が提供される。該プロモーター
は、外来遺伝子と連結し、様々な植物体に導入すること
により、該植物体中での該外来遺伝子の花卉特異的な発
現を誘導することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のDNAからなるリンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター。

(a) 配列番号1に示す塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーターの機能を有するDNA

【請求項2】 請求項1記載のプロモーター及び外来遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【請求項3】 請求項3に記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、リンドウのカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター、該プロモーター及び目的遺伝子を含む組換え発現ベクター並びに該発現ベクターによって形質転換された形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、遺伝子工学的手法によって植物に有用な遺伝子を導入する際、その遺伝子の発現を制御するために様々なプロモーターが用いられてきた。よく用いられてきたものとしては、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーター(Odell et al., Nature, 313, 810-812, 1985)やノバリンシンターゼ(NOS)プロモーター(Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573, 1982)がある。しかし、これらのプロモーターの発現誘導の組織特異性が低いことから、導入遺伝子の影響が目的の組織以外にも現れることがしばしば見られた。そこで、発現誘導の組織特異性の高いプロモーターが求められてきた。

【0003】カルコン合成酵素遺伝子は、組織特異的に発現し、発現量も高いことが知られており、そのプロモーターの発現誘導の組織特異性が高いことが予想された。カルコン合成酵素はフラボノイド合成系において最も重要な酵素であり、1分子の4-クマロイル-CoAと3分子のマロニル-CoAの縮合を触媒してナリンゲニルカルコンを生成する。

【0004】フラボノイドは花卉や果実における色素形成に関わっている(Brouillard, In The Flavonoids, Advances in Research Since 1980, pp.525-538, 1988)ほか、感染に対する防御(Dixon, Biol. Rev., 61, 239-291, 1986; Lamb et al., Cell, 56, 215-224, 1989)や、UV光に対する防御(Schmelzer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2989-2993, 1988)にも関わっていることが知られている。また、オーキシン輸送(Jacobs and Rubery, Science, 241, 346-349, 1988)や昆虫に対する耐性(Hedin and Waage, In Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 213, pp.87-100, 1986)にも関与していることが示唆されている。その

他にも様々な生理現象に関与していると考えられる。

【0005】リンドウの花色はフラボノイドの一種であるアントシアニンによることが知られており(Goto et al., Tetrahed. Lett., 23, 3695-3698, 1982)、これまでにそのアントシアニン生合成に関与すると考えられるカルコン合成酵素の遺伝子がリンドウ花卉のcDNAライブラリーより単離されている(特開平8-89251号)。しかし、リンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーターはいまだに単離されておらず、その解析もなされていなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】近年、植物において遺伝子工学的手法が進歩し、外来遺伝子を植物体中で発現させる技術が確立している。本発明の課題は、リンドウの花弁特異的なカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を植物体より単離し、その塩基配列を決定し、その遺伝子発現誘導の組織特異性を利用することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行なった結果、組織特異的に、かつ効率的に発現するリンドウのカルコン合成酵素遺伝子のプロモーターを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の(a)又は(b)のDNAからなるリンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター

(a) 配列番号1の塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーターの機能を有するDNAである。

【0008】ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし」とは0.9 M NaCl、90mMクエン酸ナトリウム、0.1 % フィコール400、0.1 % ポリビニルピロリドン、0.1 % 子ウシ血清、アルブミン、0.1 % ドデシル硫酸ナトリウム、100 μ g/ml変性サケ精巣DNA、pH 7.0、65℃の溶液中で、1晩ハイブリダイゼーションを行い、0.3 M NaCl、30mMクエン酸ナトリウム、0.1 % ドデシル硫酸ナトリウム、pH 7.0、65℃の溶液中で、30分洗浄した場合でもハイブリダイズしていることを意味する。さらに、本発明は上記プロモーター及び外来遺伝子を含む組換え発現ベクターである。さらに、本発明は上記の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体である。

【0009】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。本発明は下記の工程により実施される。

(1) リンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーターの単離

リンドウカルコン合成遺伝子のプロモーター配列の単離

は以下述べるinversePCR法によって行なう。まず、リンドウの花弁組織よりgenomic DNAを抽出し、精製する。次に、リンドウカルコン合成酵素遺伝子の配列情報を基に翻訳領域内部で一カ所切断する制限酵素を用いてgenomic DNAを消化した後、自己連結反応(self ligation)を行なう。得られた連結反応(ligation)産物をテンプレートとしてPCR反応を行なう。プライマーとしては、リンドウカルコン合成酵素遺伝子の制限酵素切断部位の上流の塩基配列に対し、互いに外側を向くような35merの一对のオリゴマーを合成して用いる。PCR反応には、例えばLA PCR Kit (Takara社製)を用いることができる。Inverse PCR法によって増幅されたDNA断片は、例えばTA Cloning Kit (Invitrogen社製)によってプラスミドベクターにサブクローニングすることができる。

【0010】(2)プロモーターの塩基配列の決定
上記(1)で得られたプロモーターの塩基配列の決定は、プライマー・ウォーキング法により、蛍光自動シーケンサー(ABI社製)を用いて決定することができる。

【0011】(3)プロモーター活性のアッセイ
このようにして得られたDNA断片のプロモーター活性を確認するために遺伝子導入ベクターpBI101(Clontech社製)中のレポーター遺伝子であるβ-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子と連結したキメラ遺伝子を構築する。このキメラ遺伝子をアグロバクテリウム法によって植物体に導入する。植物体としては、例えばベチュニアやタバコを用いることができる。形質転換体中でリンドウカルコン合成遺伝子のプロモーターによって発現誘導されたGUSの定量を蛍光定量法によって行なう。

プライマー1:

5'-GGTGACCGTTGAGGAGATCAGAAAAGCTCAGAGAG-3' (配列番号2)

プライマー2:

5'-AAAGGTTTGGCTGCCGAGAAAATGTTGAGGAGAG-3' (配列番号3)

Inverse PCR法によって増幅されたDNA断片をアガロース電気泳動にかけ、GENECLEAN II (BIO101社製)を用いて精製した。次に、このDNA断片をTA Cloning Kit (Invitrogen社製)を用いてpCR II中にサブクローニングした。

【0015】(2)プロモーターの塩基配列の決定
クローニングされたリンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーターの塩基配列はプライマー・ウォーキング法により、蛍光自動シーケンサー(ABI社製)を用いて決定した。得られた塩基配列をDNASIS (Hitachi Software Engineering社製)を用いて解析した。その結果、翻訳開始ATGコドンより124 bp上流にTATAboxが認められた。また、花卉特異的遺伝子発現制御に関与していると考えられているMYB蛋白質やMYC蛋白質の結合配列も存在することが判明した。このプロモーターの塩基配列を配列番号1に記載する。

【0012】

【発明の効果】本発明により、リンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター部位が提供される。該プロモーターは、外来遺伝子と連結し、様々な植物体に導入することにより、該植物体中での該外来遺伝子の花卉特異的な発現を誘導することができる。

【0013】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、核酸を扱う基本的な方法は、T. Maniatisらの「Molecular Cloning」(Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)に従って行なった。

【0014】〔実施例1〕

(1)プロモーター配列の単離

リンドウカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を単離するために以下のようにinverse PCR法を用いた。リンドウ(*Gentiana triflora* cv. Maciry)の花弁組織1gより、DNA Extraction Kit (Stratagene社製)を用いてgenomic DNAを抽出し、精製した。リンドウカルコン合成酵素遺伝子の配列情報(特開平8-89251号公報)を基に翻訳領域内部で一カ所切断する制限酵素EcoT141を用いてgenomic DNAを消化した後、DNA Ligation Kit ver.2 (Takara社製)によって自己連結反応を行なった。得られた連結反応産物を鋳型としてInverse(インバース)PCR反応に供試した。Inverse PCR反応にはLA PCR Kit (Takara社製)を用い、プライマーとしてリンドウカルコン合成酵素遺伝子の制限酵素切断部位の上流の塩基配列に対し、互いに外側を向くような35merの一对のオリゴマーを合成した。プライマーの塩基配列は、以下に示すとおりである。

【0016】(3)発現ベクターの構築

得られたプロモーターDNAをpBI101プラスミド(Clontech社製)のGUS遺伝子に連結し、キメラ遺伝子を構築した(図1)。リンドウカルコン合成酵素遺伝子プロモーターがサブクローニングされたpCRIIをEcoT141で切断し、DNA Blunting Kit (Takara社製)によって末端を平滑にした。さらにそのプラスミドをXbaIで切断し、平滑末端とXbaI末端を持つpBI101断片を作成した。以上のように作成されたリンドウカルコン合成酵素遺伝子プロモーター断片とpBI101断片をDNA Ligation Kit (Takara社製)を用いて連結することにより、リンドウカルコン合成酵素遺伝子プロモーターがGUS遺伝子に連結されたキメラ遺伝子を含む発現ベクターが構築された。

【0017】(4)発現ベクターの植物体への導入
作成した発現ベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 (Ooms

et al., Gene, 14, 33 ~50, 1981, CBS 191.83) に導入した後、通常の葉片形質転換法 (Horsch et al., Science, 227, 1229-1231, 1985) によってペチュニア (*Petunia hybrida* cv. Polo Red Target) への遺伝子導入を行なった。Gene Pulser (Bio-Rad 社製) を用いて作成した発現ベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 (CBS 191.83) に極板間が 0.2cm、抵抗200Ω、電気容量25μF、電圧2.5 kVの条件で導入した。ペチュニア (*Petunia hybrida* cv. Polo Red Target) への遺伝子導入は以下に述べる通常の葉片形質転換法 (Horsch et al., Science, 227, 1229-1231, 1985) によって行った。ペチュニアの葉を発現ベクターを持つLBA4404 中で切断した後、植物ホルモンを含まないMS固形培地 (Murashige et al., Physiol. Plant., 15, 473-497, 1962) 上で2日間培養した。次に1ppm ベンジルアデニン、0.2 ppm インドール酢酸、200ppmセフォタキシム、300ppmカナマイシンを含むMS固形培地上で約1ヵ月培養し、遺伝子が導入されたカルスの選抜を行った。同じ組織の培地上で培養を続けることによって、選抜されたカルスからシュートが形成された。そのシュートを200ppmセフォタキシム、100ppmカナマイシンを含み、植物ホルモンを含まないMS固形培地に移して根を形成した後、栽培用の土に移して馴化を行った。

【0018】(5) GUS 活性の検出

GUS 活性の蛍光定量法 (Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep., 5, 387-405, 1987) については、以下のようにして行なった。すなわち、植物試料100mgを抽出緩衝液(50

mM リン酸バッファー (pH 7.0)、10mM EDTA、0.1% サルコシル、0.1% Triton X-100 および10mM β-メルカプトエタノール) 200ml中で磨砕し、磨砕液を遠心分離した。上清150μlに2mMの4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド (4MUG) を等量加え、37℃で1時間処理した。酵素反応を 0.2M Na₂CO₃ を加えて停止させた後、4-メチルウンベリフェロン (4MU) の蛍光を蛍光分光光度計 (U-2000; Hitachi社製) を用いて測定した。

【0019】遺伝子導入個体においてGUS 活性を蛍光定量法によって測定したところ、図2に示すとおり花卉で強い GUS活性が認められた。この結果は、ノーザンブロット解析の結果と合致するものであった。なお、図2において、バーはそれぞれ3系統の形質転換体において得られた測定値の標準偏差を表す。以上の結果より、リンドウカルコン合成酵素遺伝子の本プロモーターは、花卉における特異的な遺伝子発現を誘導しうる配列を少なくとも一つ含むことが明らかとなった。

【0020】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1162

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源

生物名: *Gentiana triflora* cv. Maciry

配列

```
CCATGGTTGT TAGCTATATC CCTATAATTC TTTTTTCTT TCTTAAAAA AAATGGTCCT 60
TCTCAGGAAA GAAAAAAGAA AGAAAAAGAA AGAAAGAAAG CAAACACTTT TTTTAGAGA 120
TATTTTATGA GACAACGGTT GTAGTAGGAA GATTAAATGA AGTGACATAT ATTAGAGTTT 180
TTTATTTTGA TTCTGTTTCA TATAATACAT TTTTATCGTA TGTGAGAGGC TAGAAATGAG 240
TGATTGTAAT ACATACCACT CGGTAACAACA TTATTTTAAA ATTCACTTTT TTTGGGAATA 300
GAGATATACT TTATATGTGT CTCTGATGTG AACCGTTTAA GCAACGATCC GGACGGGCAA 360
AATCCCATTG CCTAGTGGTT ATTACCCAGG TTCCAGTAGT GGGAGATCCG GGTTCGATTC 420
CCACTTCCCA CCTTTCGTTT CAGATGAAAA AAACAAAAA AAAACAACCC CAGACCCTTC 480
TTAAAACTTT ATTTTCCAGA CCATGTTTTT ATATAATAGC AGTGCAATTA AGGTTTTTTT 540
TTTTCTTCAA ATTTATAAGC TAAAAGTAAC TTATAAATC AAATCAATAC GTATATTCTC 600
TTAAAAAAT ATCGAATTTT TATATCGTTT TTTATACCTA TTCATCTGTC TGTTTTGAGC 660
TGTTTAGACG TGAATGCTCT GCGCTCTTAT CGTCCTTTGT TTCATCATCT TTTACATTG 720
TCAAACGTAC TAACAAATTT TCGGACGCAT TTGTTGGCTA GACATGAGCT AGGTCATACT 780
GGTCGTAATG TTTGGAATTC TTTCCCATTT ATGATGTAAT CTCCGCCCGT TATTACAGAT 840
AATTTATTTT TTCCTTAAAA AAAAATTAAT ATTAATTTT AAAAAGTTAA AAAACAAAA 900
AACAAATATA TATGTCGTTT ATAATTTTGT AAAGAAATGT TTTTTTTTTT TTTTGAATA 960
CTAAAGAAAT GTTTTAAGTA TGTATTTTAT CGGGTAGGCA GGTACACGTG AAATTGAGCT 1020
AACCAGCACA AGCCAATTTT AGTTTCCTTC TGTATATAAT ACCAACCAGT CCTCCCCCAT 1080
TCITTCATCA TCACTTACTG CAATTCACCG TTTTCCGAA TTAATTTCTC TCCTCAACAT 1140
TTTCTCCGGC AGCCAAACCT TT 1162
```

【0021】配列番号:2

配列の長さ:35

配列の型:核酸

配列

GGTGACCGTT GAGGAGATCA GAAAAGCTCA GAGAG

35

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

【0022】配列番号:3

配列の長さ:35

配列の型:核酸

配列

AAAGGTTTGG CTGCCGAGA AAATGTTGAG GAGAG

35

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

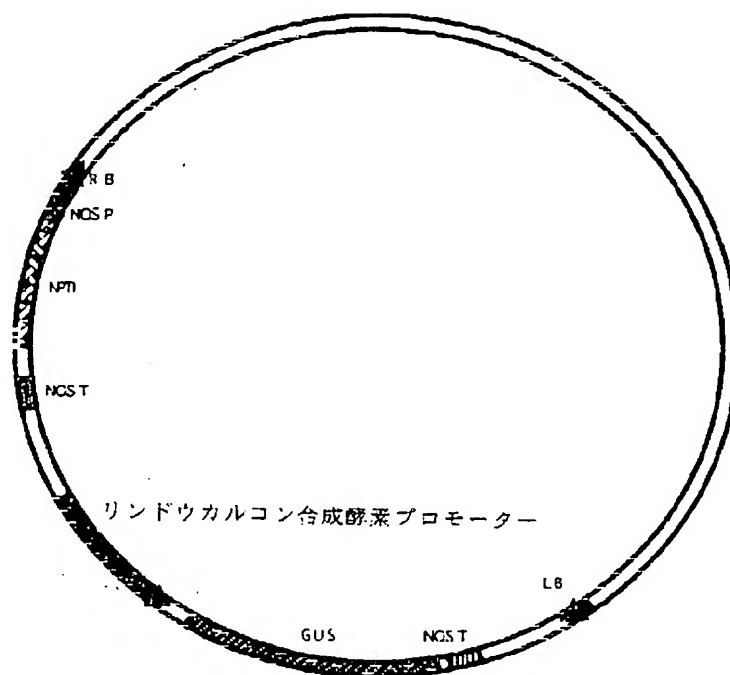
配列の種類:他の核酸(合成DNA)

【図面の簡単な説明】

【図1】リンドウカルコン合成酵素遺伝子プロモーターがGUS遺伝子に連結されたキメラ遺伝子を含む発現ベクターを示す図。

【図2】ベチュニアの各組織においてリンドウカルコン合成酵素プロモーターによって誘発されたGUS活性の蛍光測定法による測定結果を示す図。

【図1】



【図2】

